

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kristýna Urbánková

VLIV DIKLOFENAKU NA FYTOEXTRAKCI NAPROXENU

Influence of Diclofenac on Naproxene Phytoextraction

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Urbánková Kristýna

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Poděkování:

Děkuji vedoucímu práce Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za poskytnuté informace, obětovaný čas a trpělivost při psaní této bakalářské práce a Ing. Šárce Pšondrové za odborný dohled a pomoc při experimentální části této práce

Abstrakt

Přítomnost organických sloučenin ze skupiny farmaceutických substancí v povrchových vodách je v posledních letech považována za pseudo-perzistentní kontaminaci s možnými negativními biologickými účinky. Jednou z metod omezení vstupu těchto látek do ekosystému je použití biotechnologických metod k dočišťování výtoků z čistíren odpadních vod.

V modelových *in vitro* experimentech byla sledována fytoextrakce naproxenu a diklofenaku rostlinami kukuřice, slunečnice a řepky v podmínkách monokomponentního a multikomponentního znečištění. V případě jednotlivých substancí byla nalezena fytoextrakční schopnost. Narozdíl od kukuřice, slunečnice rozlišuje testované substance v závislosti na použitém kultivaru (80% a 34% extrahovaného naproxenu a diklofenaku po 24 hodinách), v případě řepky nejsou rozdíly tak významné (50% naproxenu, 33% pro diklofenak). Obecně je naproxen extrahován z media snadněji, přítomnost diklofenaku snižuje záchyt naproxenu u všech testovaných kultivarů.

Klíčová slova:

Naproxen

Diklofenak

Fytoextrakce

Odpadní vody

Abstract

The presence of organic compounds from commonly used pharmaceuticals in surface waters is considered to be pseudo-persistent contamination with possible negative biological effects. One of the methods for limited entering of these compounds into ecosystem is using biotechnological processes for secondary treatment of sewage treatment plants effluent.

Phytoextraction of naproxene and diclofenac was observed in plants like sunflower, maize and rape using *in vitro* experiments under different conditions – monocomponent and dicomponent artificial pollution. In the experiments with individual substances the ability of phytoextraction was found in all cases. Contrary to results with maize, sunflower has different phytoextraction ability for naproxene and diclofenac (80 % vs. 34 % of extracted naproxene and diclofenac after 24 hours of experiment) and amounts of extracted material are dependent on used cultivar. In case of rape the difference between both tested substances is not so big (5 % of naproxene vs. 33 % of diclofenac). Generally naproxene is phytoextracted more easily from the medium, whereas the presence of diclofenac decreased uptake of naproxene in all tested cultivars.

Keywords:

Naproxene

Diclofenac

Phytoextraction

Wastewater

OBSAH:

1. ÚVOD.....	7
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
3.1. Farmaka v přírodě.....	9
3.1.1. Způsob kontaminace životního prostředí.....	9
3.1.2. Rozdělení farmak ve vodě.....	10
3.1.2.1. Detekce farmak v pitné vodě.....	10
3.1.2.2. Detekce farmak v povrchové vodě.....	11
3.1.2.3. Detekce farmak v podzemních vodách.....	12
3.2. Možnosti odstranění kontaminace.....	13
3.2.1. Fytoextrakce.....	13
3.2.2. Fytodegradace.....	13
3.2.3. Fytostabilizace.....	14
3.2.4. Rhizodegradace.....	14
3.2.5. Rhizofiltrace.....	14
3.2.6. Fytoakumulace.....	15
3.2.7. Fytovolatilizace.....	15
3.3. Naproxen.....	16
3.4. Diklofenak.....	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	17
4.1. Použitý materiál, metody, přístroje.....	17
4.1.1. Chemikálie.....	18
4.1.2. Přístroje.....	18
4.1.3. Rostlinný materiál.....	18
4.2. Příprava <i>in vitro</i> kultur.....	18
4.3. Fytoextrakce naproxenu a její ovlivnění diklofenakem.....	19
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	20
6. ZÁVĚR.....	29

1. ÚVOD

S rostoucím rozvojem komfortu lidské populace se zvětšuje i kontaminace životního prostředí. Vlivem tzv. antropogenní kontaminace životního prostředí se rok od roku zvětšuje seznam ohrožených druhů rostlin i zvířat, dochází k nevratným změnám jednotlivých ekosystémů, celkový výčet negativních vlivů člověka na jeho okolí by byl velmi rozsáhlý. O vliv člověka na přírodu se začali lidé starat relativně nedávno a pod názvem antropogenní kontaminant rozumíme především perzistentní organické polutanty (mezi něž patří např. DDT a některé organické pesticidy, PCB = polychlorované bifenyly, PAH = polyaromatické uhlovodíky), polybromované retardátory hoření, detergenty, potravinářská aditiva, anorganické chemikálie obsahující těžké kovy, aditiva do polymerů, produkty osobní péče (mýdla, opalovací krémy, kosmetické přípravky, sprchové gely, přípravky na péči o vlasy, parfémy apod.), dezinfekční přípravky, prostředky na praní a v neposlední řadě léčiva.

Skupina látek s reálnou či potenciální možností ovlivnění životního prostředí, které se v posledních letech věnuje zvýšená pozornost, se nazývá PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) a zahrnuje veterinární i humánní léčiva od primárních sloučenin až po metabolity a složky produktů osobní péče.

Rizikovitost dlouhodobého působení těchto látek spočívá v jejich prokázané či potenciální schopnosti zasahovat do systému hormonální regulace živočichů. Takovéto látky jsou označovány jako EDCs (Endocrine Disrupting Chemicals = látky ovlivňující endokrinní systém)¹.

Na základě uvedených skutečností se globálně vyvíjí snahy o nalezení způsobu odstranění rizikových látek. Jako nejideálnější se jeví jejich odstranění v čistírnách odpadních vod (ČOV), kde je značná část odpadních vod čištěna. Vzhledem k nevhodné konstrukci ČOV k odstraňování léčiv se musí přistoupit k alternativním řešením jakým je například kořenová čistírna odpadních vod (KČOV) fungující na principu rhizofiltrace. Tato metoda se jeví jako ekonomicky nejvýhodnější při eliminaci nízkých koncentrací znečištění léčivy ve velkých objemech vody².

2. CÍL PRÁCE

V rámci studia použití biotechnologických metod k dočištění odpadních vod bylo zjištěno, že v reálném případě multikomponentního znečištění dochází k vzájemnému ovlivnění množství zachycovaných substancí. Princip zachytu organických látek kořenovým systémem rostlin není příliš známý, a proto je vhodné studovat vzájemné interakce substancí při fytoextrakci jako zdroje dat pro pozdější vyhodnocení možných mechanismů. Aby projekt měl i případný praktický dopad byly pro studium zvoleny látky z oblasti léčiv.

Vzhledem k velké spotřebě léků proti bolesti nevázaných na lékařský předpis, je práce zaměřena na studium nesteroidních antirevmatik (NSAIDs z anglického Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) a to konkrétně na vliv diklofenaku (Diclofenac AL tbl., Voltaren Rapid tbl. apod.) na fytoextrakci naproxenu (Emoxen gel, Nalgesin S tbl. apod.).

Řešení projektu obsahuje:

1. Přípravu sterilních rostlin kukuřice, řepky a slunečnice *in vitro*.
2. Kultivace v mediu obohaceném o naproxen, diklofenak či jejich směs.
3. Odběr vzorků ve 24 hod. intervalech za sterilních podmínek.
4. Porovnání fytoextrakční schopnosti zkoumaných rostlinných druhů.

Tab.1. – Spotřeba naproxenu a diklofenaku v roce 2010

	Počet expedovaných balení [ks]	Přibližná expedované substance [kg]	hodnota
Naproxen	456540	2300	
Diklofenak	3286509	8200	

3. TEORETICKÝ ÚVOD

3.1. Farmaka v přírodě

3.1.1. Způsob kontaminace životního prostředí

Primárním zdrojem odpadních léčiv či jejich metabolitů jsou sami jejich uživatelé ať již jde o veterinární preparáty či humánní léčiva (západní Montana 2007: acetaminophen, kodein, carbamazepin, nikotin, kofein, erythromycin, warfarin a další byly detekovány v odpadních vodách³). Aktivní látky či jejich metabolity jsou po užití léku vylučovány (stolice, moč) a s pomocí odpadních vod jsou dále distribuovány až k čistírnám odpadních vod, které nejsou schopny rezidua zcela zachytit a tak mohou následně přes říční biocenózu působit i v povrchových vodách a není vyloučena kontaminace podzemních vod. S veterinárními preparáty je to obdobné, velmi jednoduše mohou kontaminovat půdu (výkaly, močůvka) a podzemní vody. V případě velkých srážek se dá uvažovat vyplavení těchto reziduí z půdy a může dojít ke kontaminaci povrchových vod.

Dalším nebezpečím může být používání čistírenských kalů jakožto druhotných hnojiv na zemědělských plochách, v tomto případě mohou kontaminanty proniknout až do potravních řetězců.

Na opačné straně této problematiky stojí fakt neekologického zacházení s prošlými či nespotřebovanými léčivy ať už se jedná o jejich splachování do kanalizací nebo vyhazování na skládku, kde je vysoké riziko průsaků do podzemních vod.

Nelze opomenout možnosti kontaminace přímo farmaceutickým průmyslem, ovšem oproti kontaminaci přímým užíváním léčiv je toto riziko takřka zanedbatelné.

Od kontaminace podzemních vod již není tak daleko ke kontaminaci vody vodovodní.

V České Republice již proběhly a dále probíhají studie výskytu léčiv v odpadních a povrchových vodách a studie vody pitné jakožto odpověď na šířící se mediální zprávy.⁴

V poslední uveřejněné zprávě Státního zdravotnického ústavu (SZÚ) o stavu pitné vody za rok 2009 v ČR není o léčivech žádná zmínka.⁵

Na základě článku o vytipovaných léčivých látkách pro testování pitné vody připravovaný v rozmezí let 2009-2011 patří naproxen i diklofenak dle SZÚ mezi pěti podezřelých látek⁶ viz. Tab. 2.

Tab. 2. – Látky navržené pro testování v pitné vodě dle SZÚ

Látka	Léková skupina
Karbamazepin	Antiepileptikum
Naproxen	Protizánětlivé a antirevmatické přípravky
Ibuprofen	Protizánětlivé a antirevmatické přípravky
Diklofenak	Protizánětlivé a antirevmatické přípravky
Ethinylestradiol	Steroidní kontraceptivum

3.1.2. Rozdělení farmak ve vodě

3.1.2.1. Detekce farmak v pitné vodě

Se zvyšující se nutností opětovného využití odpadních vod jako vod užitkových a doplňujících vod pitných se zvyšuje riziko průniku nežádoucích látek do vodních zdrojů. Následně hrozí kontaminace podzemních vod, které slouží jako zdroj vodovodní vody. Současné technologie v úpravnách vod však nejsou schopny odstranit nízké koncentrace organického znečištění. Kontaminace některými farmaky je často studována právě ve vodovodní vodě a přítomnost těchto látek byla prokázána v řadě studií v různých částech světa.

Tab. 3. – Studie kontaminace vodovodních vod farmaky

Xenobiotikum [koncentrace a metoda stanovení]	Lokalita detekce
Diklofenak [<0,25 ng/l ⁸ , 20-60 ng/l ⁷ , SPE-GC-MS ⁷ , SPE-LC-MS/MS ⁸]	Brazílie ⁷ , USA ⁸
Naproxen [<0,5 ng/l ⁸ , <26 ng/l ⁹ , SPE-HPLC ⁹ , LC ⁸ - MS/MS]	USA ⁸ , Slovinsko ⁹
Klofibrová kyselina [<10-20 ng/l ⁷ , 270 ng/l ¹⁰ , SPE-GC-MS]	Brazílie ⁷ , Německo ¹⁰ , Itálie ¹⁰ , UK ¹⁰ , Kanada ¹⁰ , USA ¹⁰
Karbamazepin [6,8 ng/l ⁸ , 258 ng/l ¹⁰ , SPE-LC-MS/MS]	USA ^{8,10} , Německo ¹⁰ , Itálie ¹⁰ , UK ¹⁰ , Kanada ¹⁰ ,
17β-estradiol [<0,5 ng/l, SPE-LC-MS/MS]	USA ⁸

3.1.2.2. Detekce farmak v povrchové vodě¹¹

Vlivem koloběhu vody mezi domácnostmi a čistírnami odpadních vod, kde nejsou farmaka kvalitně zachytávána, se samozřejmě mohou dostat až do vodstva povrchového, kde mohou působit na faunu i flóru a ovlivňovat lokální ekosystémy. Mnoho studií se zabývá stanovením míry kontaminace povrchového vodstva.

Tab. 4. – Studie kontaminace povrchových vod farmaky

Xenobiotikum [koncentrace a metoda stanovení]	Lokalita detekce
Diklofenak [10-120 ng/l ¹² , 20-60 ng/l ⁷ , SPE-GC-MS]	Brazílie ⁷ , Švédsko ¹²
Ibuprofen [10-220 ng/l ¹² , 8,7-32 ng/l ¹⁴ , 3110 ng/l ¹³ , SPE-GC ^{12,14} /LC ¹³ -MS]	Švédsko ¹² , USA ¹³ , Německo ¹⁴
Naproxen [90-250 ng/l ¹² , 10-50 ng/l ⁷ , SPE-GC-MS]	Brazílie ⁷ , Švédsko ¹²
Paracetamol [78-610 ng/l ¹⁵ , <50 ng/l ¹⁶ , SPE- LC ¹⁵ /HPLC ¹⁶ -MS/MS]	Srbsko ¹⁵ , UK ¹⁶
Klofibrová kyselina [<10-30 ng/l ⁷ , ND-18,6 ng/l ¹⁷ , SPE-GC- MS]	Brazílie ⁷ , Severní moře ¹⁷
Linkomycin [60 ng/l ⁸ , 3,13-248,90 ng/l ¹⁸ , SPE- LC ⁸ /HPLC ¹⁸ -MS]	USA ⁸ , Itálie ¹⁸

ND= nebylo detekováno

3.1.2.3. Detekce farmak v podzemních vodách^{2,19,20}

Dosud bylo provedeno jen velmi málo studií zabývajících se podzemními vodami a jejich kontaminací léčiv. Ve většině případů pocházejí nalezené látky z blízkých skládek či ČOV a nenapovídají nám nic o globálním stavu věci. Poměrně nízké znečištění podzemních vod souvisí nejspíše s jejich dobrou izolací od povrchových vod. Přesto však dle několika studií byl detekován diklofenak a kyselina klofibrová i v podzemních vodách, které neměly opodstatnění v blízké skládce, ČOV ani farmaceutickém zařízení, avšak články neuveřejňují hodnotu detekovaného množství.

3.2.Možnosti odstranění kontaminace²¹

Jednou z možností jak odstranit polutanty z životního prostředí je využití tzv. přirozené atenuace (= přirozené snižování kontaminace). Jako přirozené snižování kontaminace je považován sled dějů přirozených pro životní prostředí, které probíhají i bez zásahu člověka a snižují toxicitu, koncentraci kontaminantu, objem kontaminantu či jeho mobilitu.

Fytoremediace je definována jako využití zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů, půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění nebo transformaci kontaminantů životního prostředí. Uplatňují se čtyři různé procesy jako extrakce kontaminantů z půdy a vody (specielně těžké kovy a radionuklidy), degradace a volatilizace organických sloučenin (i anorganické jako např. Hg, As, Se) a stimulace mikrobiálního metabolismu v rhizosféře. Fytoremediační techniky se dělí dle typu kontaminantu a jeho zpracování rostlinami.

3.2.1. Fytoextrakce

Fytoextrakce je založena na osázení kontaminované plochy rychlerostoucími rostlinami schopnými kontaminanty akumulovat. Po akumulaci jsou rostliny sklizeny a zpracovány (tepelně, mikrobiálně nebo chemicky). Metoda se užívá hlavně pro odstranění toxických kovů. Jsou známé rostliny, které jsou schopny akumulovat kovy do vysokých koncentrací (o jeden až dva řády vyšší než ostatní rostliny) bez vlivu na rostlinný růst a vývoj. Takovýmto rostlinám se říká hyperakumulátory.

3.2.2.Fytodegradace

Fytodegradace je zachycení organických látek, jejich přeměna a odbourávání uvnitř rostliny. Přeměněný kontaminant je v rostlině uskladněn nebo uvolněn do prostředí, může dojít i ke kompletní transformaci na oxid uhličitý a vodu. Podmínkou je zajistit, aby nedocházelo k přeměně na toxičtější metabolit než samotný polutant. Z toho vyplývá, že metoda je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech polutantů a jejich rozpustnosti

v rostlině. Využívá se k odstranění především PAH, PCB, výbušnin, detergentů, ropných látek, organofosfátových pesticidů apod.

3.2.3.Fytostabilizace

Fytostabilizace se využívá ke stabilizaci kontaminovaných míst, kde v důsledku přítomnosti toxických kontaminantů není dostatečný pokryv vegetací či není možné znovuosazení běžnou vegetací z důvodů vysoké kontaminace polutanty. Může tak docházet k erozi nebo vyplavování kontaminantů a tím k rozšiřování kontaminace, čemuž zabraňuje kořenový systém díky adsorpci, absorpci, komplectaci a precipitaci kontaminantu. Jde o snahu zamezit dalšímu šíření kontaminace. Rostliny vhodné pro fytostabilizaci jsou odolné vůči vysokým koncentracím toxických látek. Závisí na chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech půdy. Dále se při fytostabilizaci uplatňuje vliv produkce huminových látek, které mají schopnost vázat kontaminanty v půdě.

3.2.4.Rhizodegradace

Rhizodegradace je pomocí kořenů stimulovaná mikrobiální degradace organických sloučenin. Je založena na základě zvýšení množství půdních bakterií díky kořenům rostlin uvolňujícím do půdy organické sloučeniny jako cukry a alkoholy, jež fungují jako potrava pro bakterie. S dostatkem živin počet mikroorganismů vzrůstá a stimuluje se jejich aktivita, což vede k odbourávání okolních polutantů. Jako příklad lze uvést jabloň uvolňující flavonoidy, které stimuluje degradaci PCB.

3.2.5.Rhizofiltrace

Rhizofiltrace se aplikuje na odstranění kontaminantů z povrchových, splaškových či podzemních vod. Dochází k precipitaci či absorpci na kořenovém systému rostlin. Používá se především k odstranění kovů a radionuklidů. U této metody jsou cílovou částí rostliny

kořeny. Metoda se ukázala jako cenově výhodná pro dekontaminaci velkých objemů vod s nízkými koncentracemi polutantů a např. v Černobyli je úspěšně používána pro odstranění isotopů Cs a Sr z povrchových vod.

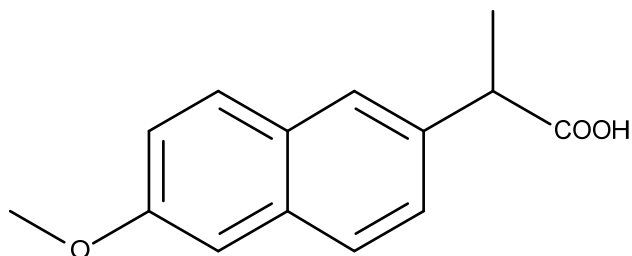
3.2.6.Fytoakumulace

Fytoakumulace je založena na absorpci polutantu kořeny s následnou akumulací v nadzemních částech rostliny. Nutná je hyperakumulační schopnost vybraných rostlin. Tato metoda je používána pro dekontaminaci od těžkých kovů, polokovů, radionuklidů a nekovů. Není příliš vhodná pro organické látky, jelikož mohou být rostlinou metabolizovány na daleko toxičtější sloučeniny, případně mohou být rostlinou tzv. vydýchány do ovzduší. Po akumulaci látek rostlinami je třeba rostliny sklidit a zvážit jejich další osud jakožto odpadu.

3.2.7.Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je metoda založená na schopnosti některých rostlin metabolizovat kontaminanty do těkavé formy a na schopnosti zachycovat těkavé organické sloučeniny z okolního prostředí (například topol) [2]. Následně jsou těkavé metabolity uvolněny do atmosféry, což je dosti kontroverzní metoda, jelikož nedochází k odstranění kontaminace nýbrž k jejímu přesunu do ovzduší. Je tedy vyžadováno monitorování ovzduší. Metodu lze aplikovat na odstraňování organických polutantů jako je MTBE (methyl-t-butylether) a jiné složky benzínu. Dalším možným využitím je odstraňování Hg z půdy pomocí topolu žlutého.

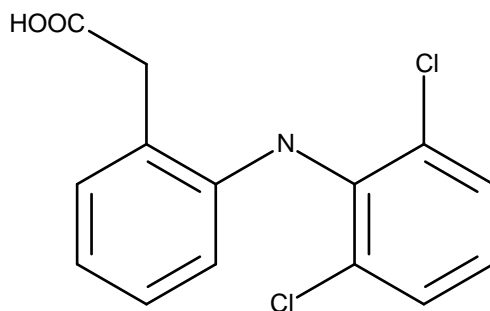
3.3. Naproxen²²



Naproxen [kyselina *S*(+)-2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová] je podáván ve formě sodné soli jako nenarkotizující nesteroidní analgetikum s antipyretickým a protizánětlivým účinkem, jehož hlavním mechanismem účinku je inhibice cyklooxygenasy. Perorálním (p.o.) podáním se sodná sůl naproxenu velmi rychle rozpouští a je rychle a úplně vstřebána z gastrointestinálního traktu přičemž své maximální koncentrace dosahuje po 1 až 2 hodinách u naproxenu samotného po 2 až 4 hodinách v závislosti na jídle, proto se užívá sodná sůl. Ačkoliv jídlo zpomaluje absorpci, celkové množství sorbované látky se nemění. Ustáleného stavu koncentrace v organismu se dosáhne po pravidelných 4 až 5 p.o. dávkách, tj. za 2 až 3 dny. Koncentrace naproxenu v plazmě roste lineárně se vzrůstající dávkou až do svého maxima při 500 mg, pak už dochází jen k malým změnám.

Eliminace probíhá ze 70 % v nemetabolizovaném stavu (10 % se vylučuje v nezměněné formě a 60 % jako konjugát s kyselinou glukuronovou). Zbýlých 30 % se metabolizuje na neaktivní 6-dimethyl-naproxen. Zhruba 95 % se eliminuje močí a zbytek stolicí.

3.4. Diklofenak²³



Diklofenak [kyselina {2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}octová] je podáván ve formě sodné soli a řadí se mezi skupinu nesteroidních analgetik s antipyretickým a protizánětlivým účinkem. Řadí se mezi deriváty kyseliny fenyl octové s mechanismem účinku založeným na inhibici enzymu cyklooxygenasy.

Při perorálním i rektálním podání se účinná látka kompletně absorbuje a dosahuje maximální plasmatické koncentrace při p.o. podání asi po 90 minutách a při p.r. podání za 30 minut. Při podání lékových forem s prodlouženým uvolňováním je plasmatická koncentrace na maximum po 6 hodinách. Po intramuskulárním podání je jeho maximální plasmatická koncentrace za 10 až 30 minut.

Po p.o. podání podléhá diklofenak tzv. first-pass efektu v játrech a do systémové cirkulace prostoupí asi 50 % léčivé látky. Diklofenak podléhá zhruba z 99,7 % vazbě na plasmatické bílkoviny.

Biotransformuje se v játrech, kdy se metabolity vylučují po konjugaci žlučí a močí. Asi 70 % je eliminováno ledvinami jako farmakologicky inaktivní metabolity, zbylých 30 % se vylučuje stolicí v metabolizované podobě s eliminačním poločasem cca 2 hodiny.

4.EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, metody, přístroje

4.1.1. Chemikálie

Chemikálie používané pro přípravu kultivačního media byly v kvalitě vhodné pro analýzu (Lach-Ner), myo-inositol byl v kvalitě pro tkáňové kultury (Sigma), jako sacharosa byl používán komerční krystalový cukr. Naproxen byl používán od firmy Aldrich a diklofenak od firmy Zentiva Praha.

Rozpouštědla pro HPLC (acetonitril, methanol) byla HPLC kvality (Lach-Ner). Kyselina octová p.a. byla od dodavatele Fluka, NaH_2PO_4 a H_3PO_4 od Sigma-Aldrich. Voda pro přípravu medií a mobilních fází byla připravena na přístroji Demiwa 3roi.

4.1.2. Přístroje

Pro práci ve sterilním prostředí byl používán laminární box BHSL Labox a následné kultivace byly prováděny v kultivačních boxech TCH 100 9 (Laboratorní přístroje, Praha) při stálé teplotě 25°C a světelném režimu 12 hod světlo/12 hod tma. Pro úpravu pH byl používán pH metr IQ (Scientific Instruments).

Chromatografické analýzy byly prováděny na zařízení INCOS, složeného z vysokotlakého čerpadla INCOS LCP 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS LCS 5000. Měření bylo prováděno na koloně o rozměrech 4,4 x 250 mm se sorbentem Reprosil 100-C18, 5 µm (Watrex). Detekce probíhala při vlnové délce 270 nm pro naproxen a 280 nm pro diklofenak. Nástřik vzorků byl prováděn automatickým dávkovačem ve 20 µl objemech. Jako mobilní fáze byla používána směs acetonitril/methanol/ 1 % kyselina octová ve vodě (4:2:4, v/v/v) pro naproxen a směs pufru s methanolem (2:8, v/v) pro diklofenak, přičemž pufr byl o složení:(směs 1:1 (v/v) H₃PO₄ (1g/l) a NaH₂PO₄ · 2H₂O (2,08 g/l, pH 3,2)

. Průtok mobilní fáze byl v obou případech 1 ml/min. Pro zpracování a vyhodnocení chromatografických hodnot byl používán program Clarity (Data Apex). Mez detekce 0,05 mg/l. Koncentrace byly určeny na základě kalibrační křivky.

4.1.3. Rostlinný materiál

K experimentům byla používána semena následujících druhů a kultivarů:

- Kukuřice setá (*Zea mays L.*) hybrid DKC2971 (Monsanto ČR s.r.o.)
- Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Orasole (Monsanto ČR s.r.o.)
- Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Belem (Monsanto ČR s.r.o.)
- Řepka olejka(ozimá) (*Brassica napus napus*) cv. Cadeli (Monsanto ČR s.r.o.)

4.2. Příprava *in vitro* kultur

Semena slunečnice a kukuřice byla před nasázením na živné médium sterilizována nejdříve 70% ethanolem po dobu 1 minuty a poté 10% roztokem Sava (0,5 % chlornan

sodný) dvakrát po dobu 20 minut. Semena řepky se nejdříve 1 min sterilizovaly 70% ethanolem a následně 15% roztokem Sava po dobu 20 minut. Následně byla semena (další postup již pro všechna semena stejný) přenesena do laminárního boxu a promyta třikrát sterilní destilovanou vodou a rovnou sázena do sterilních Erlenmeyerových baněk s malým množstvím sterilního kultivačního média. Semena kukuřice se sázela po 5 kusech do 500 ml baněk s 10 ml živného média, slunečnice a řepky se sázela po 5 kusech do 250 ml baněk s 10 ml živného média. Jako kultivační médium bylo použito médium dle Murashiga a Skooga²⁴ obohacené o myo-inositol (100 mg/l) a sacharosu (30 g/l), s pH upraveným ještě před sterilizací na hodnotu 5,8. Médium se sterilizovalo tepelně při 105°C po dobu 25 minut. Kultivace rostlin probíhala v kultivačních boxech při stálé teplotě 25 °C a světelném režimu 12hod světlo/12 hod tma. Při spotřebování média rostlinami, bylo médium stejného složení sterilně doplněno. Rostliny dosáhly optimální velikosti pro experimenty asi po 3 týdnech.

4.3. Phytoextrakce naproxenu a její ovlivnění diklofenakem

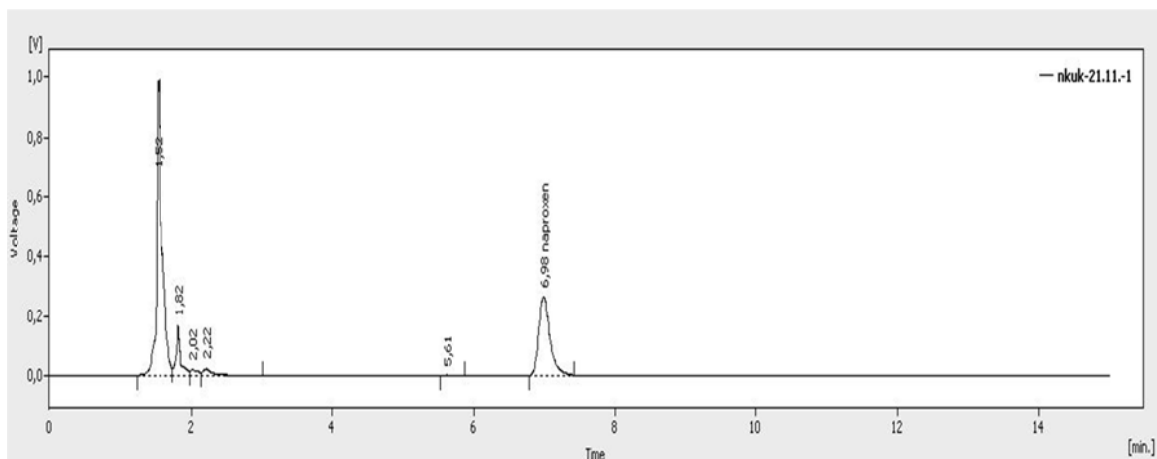
Pro cílenou kontaminaci živného média sledovanými látkami byl připraven zásobní vodný roztok naproxenu a roztok diklofenaku v ethanolu o potřebné koncentraci. Rostlinám bylo sterilně vyměněno médium za nové médium stejného složení obohacené o vypočtené množství zásobního roztoku testované látky tak, aby koncentrace testované látky byla v rozsahu přibližně 8 – 20 mg/l. Ihned po přidavku sledované látky byl odebrán kontrolní vzorek v čase $t=0$ o objemu 1 ml ke stanovení výchozí koncentrace dané sledované látky. Rostliny byly nadále kultivovány stejným způsobem a v intervalech 24 hodin byly odebrány vzorky a analyzovány HPLC/UV, čímž byla určena koncentrace v čase odběru. U některých experimentů se projevila bakteriální či plísňová kontaminace, tyto experimenty byly ukončeny a do vyhodnocení nebyly zahrnuty.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

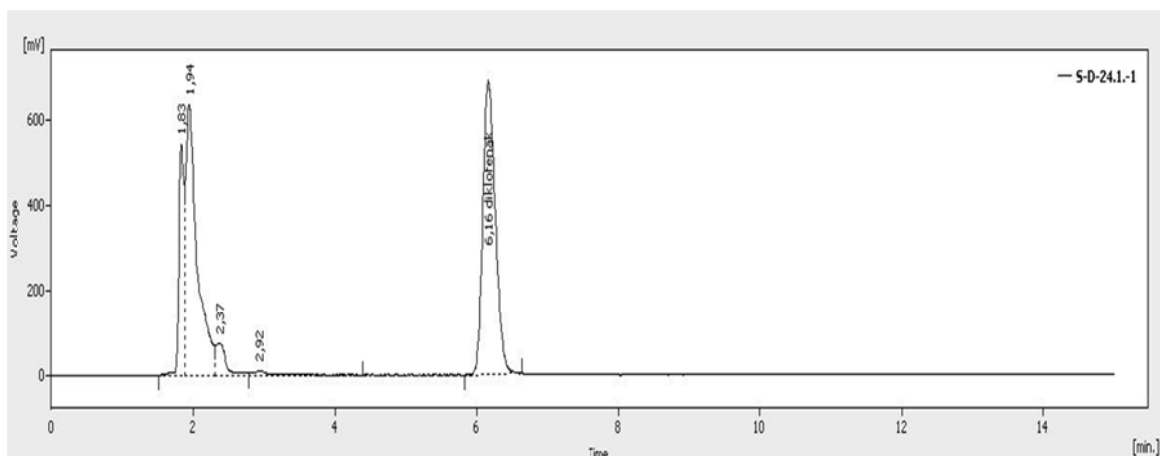
Vliv diklofenaku na fytoextrakci naproxenu byl sledován na třech rostlinných druzích (u jednoho rostlinného druhu probíhal experiment na dvou kultivarech), známých pro své fytoextrakční schopnosti dalších látek ze stejné farmakoterapeutické skupiny, jako je např. ibuprofen²⁵.

Aktuální koncentrace v mediu obohaceném o různé koncentrace naproxenu i diklofenaku byly stanovovány HPLC/UV přímým nástřikem media které bylo odebíráno ve 24 hodinových intervalech do okamžiku koncentrace pod limitem detekce či případné mikrobiální/plísňové kontaminace rostliny nebo media.

Příklad chromatogramu je uveden na Obr. 1. a 2., kde je zřejmý signál naproxenu v čase 6,90 min a diklofenaku v 6,16 min s dostatečnou separací od ostatních složek media.



Obr. 1. Chromatogram naproxenu ze vzorku kultivačního media (podmínky uvedeny v metodách)



Obr. 2.– Chromatogram diklofenaku ze vzorku kultivačního media (podmínky uvedeny v metodách)

V následující sérii Tab. 5-9 jsou uvedeny výchozí koncentrace naproxenu, diklofenaku a jejich směsi, dále pak hodnoty čerstvých hmotností rostlin po posledním odběru a aktuálních koncentrací v jednotlivých časových úsecích.

Aktuální koncentrace byly stanoveny metodou HPLC/UV a jsou uvedeny v procentech výchozí koncentrace.

Hodnoty pod mezí detekce jsou značeny - .

Průběh fytoextrakce rostlinami kukuřice je uveden v Tab. 5a.-5c.

Tab. 5a. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu rostlinami kukuřice²⁶

Kukuřice setá hybrid DKC2971 NAPROXEN						
Experiment číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]				Hmotnost rostliny [g]
		0 hod	24 hod	48hod	72 hod	
1	11,99	100	1,83	-	-	14,4
2	18,08	100	9,73	1,33	0,44	16,8
3	19,95	100	2,66	0,60	-	17,3
4	20,86	100	25,8	0,29	-	17,3
5	20,97	100	3,91	-	-	8,3

U rostlin kukuřice došlo k největšímu úbytku koncentrace naproxenu během prvních 24 hodin a to na průměrnou hodnotu pod 9% výchozí koncentrace. Dá se uvažovat daleko větší účinnost fytoextrakce, jelikož jedna rostlina vykazuje zcela vybočující hodnotu

oproti ostatním hodnotám (experiment číslo 4). Experiment byl ukončen po 72 hodinách, kdy měřitelnou koncentraci naproxenu obsahovala již pouze jedna kultivace z pěti vyhodnocovaných.

Tab. 5b. – Časový průběh fytoextrakce diklofenaku rostlinami kukuřice

Kukuřice setá hybrid DKC2971 DIKLOFENAK							
Experiment číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]				Hmotnost rostliny [g]	
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod		
1	13,47	100	6,24	0,37	-	9,8	
2	15,39	100	-	-	-	15,4	
3	15,45	100	3,17	0,39	-	14,3	
4	15,71	100	4,14	0,38	-	12,7	
5	18,00	100	0,72	-	-	13,2	

Úbytek diklofenaku během prvních 24 hodin byl u rostlin kukuřice nejrapidnější a to až na průměrnou hodnotu pod 4% výchozí koncentrace. Experiment byl ukončen po 72 hod, kdy již žádná kultivace neobsahovala měřitelnou koncentraci diklofenaku.

Tab. 5c. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu za přítomnosti diklofenaku rostlinami kukuřice

Kukuřice setá hybrid DKC2971 NAPROXEN + DIKLOFENAK											
Experiment číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]		Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]								Hmotn. rostliny [g]
			0 hod		24 hod		48 hod		72 hod		
	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	
1	11,89	15,78	100	8,07	4,89	-	-	-	-	-	14,5
2	12,28	17,93	100	15,0	6,97	0,89	0,27	-	-	-	13,6
3	12,53	14,37	100	12,9	12,4	0,40	0,97	-	-	-	8,2
4	12,58	15,96	100	14,0	9,27	-	-	-	-	-	14,8
5	19,06	15,13	100	11,0	10,2	0,37	1,39	-	-	-	13
6	19,12	11,85	100	14,4	13,8	1,88	1,10	-	-	-	10,9
7	19,82	16,38	100	6,86	6,29	-	-	-	-	-	17,1
8	20,25	15,12	100	5,19	8,53	-	-	-	-	-	15,8
9	21,21	18,3	100	7,40	4,75	0,33	0,33	-	-	-	13,5

Během 24 hodin se obsah diklofenaku snížil pod 9 % výchozí koncentrace a naproxen pod 11 % výchozí koncentrace. Což ukazuje na snížení fytoextrakce naproxenu vlivem diklofenaku a samotný diklofenak je taktéž extrahován s menší účinností. Po 72 hodinách již nebylo ani v jediné kultivaci detekovatelné množství sledovaných látek..

Schopnost fytoextrakce naproxenu, diklofenaku a jejich směsi byla sledována i na rostlinách slunečnice. V následujících Tab. 6a.-6c. jsou uvedeny naměřené hodnoty pro slunečnici roční kultivaru Orasole.

Tab. 6a. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu rostlinami slunečnice Orasole

Slunečnice roční kultivar Orasole NAPROXEN						
Experi- ment číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]				Hmotn. rostliny [g]
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod	
1	15,42	100	17,6	0,38	-	11,3
2	15,62	100	17,6	-	-	8,8
3	15,68	100	26,1	0,31	-	8,1
4	16,14	100	21,2	-	-	9,4
5	16,39	100	14,8	0,36	-	11,4

Po 24 hodinách experimentu se obsah naproxenu snížil v průměru pod 20 % výchozí koncentrace, což je podstatně menší úbytek v počátcích fytoextrakce než u kukuřice. Experiment byl ukončen po 72 hodinách shodně jako u kukuřice vzhledem k nedetekovatelnému množství naproxenu.

Tab. 6b. – Časový průběh fytoextrakce diklofenaku rostlinami slunečnice Orasole

Slunečnice roční kultivar Orasole DIKLOFENAK							
Exp. číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]					Hmot. rostl. [g]
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	
1	7,11	100	75,1	57,4	31,5	10,6	9,4
2	7,43	100	78,6	58,1	26,8	11,4	8,6
3	8,04	100	79,6	54,1	28,0	17,5	7,2
4	8,75	100	70,4	50,2	22,3	12,2	9,4
5	8,87	100	73,0	49,3	31,6	16,7	8,1

Extrakce diklofenaku rostlinami slunečnice nebyla tak účinná jako u kukuřice. Výchozí koncentrace se po prvních 24 hodin snížila průměrně pod 76 %. Po 96 hodinách experimentu byl naměřen obsah diklofenaku průměrně pod 14 %. Experiment byl po 96 hodinách přerušen. Slunečnice se nejeví jako rostlina vhodná pro fytoextrakci diklofenaku z důvodu velmi pomalé fytoextrakce oproti ostatním studovaným rostlinám.

Tab. 6c. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu za přítomnosti diklofenaku u rostlin slunečnice Orasole

Slunečnice roční kultivar Orasole NAPROXEN + DIKLOFENAK													
Ex p. č.	Výchozí koncentrace [mg/l]		Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]										Hm. rost. [g]
	N	D	0 hod		24 hod		48 hod		72 hod		96 hod		
			N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	
1	8,12	5,01	100	100	20,9	50,7	-	28,1	-	5,00	-	-	8,4
2	8,21	9,09	100	100	24,0	50,4	1,83	25,6	-	7,00	-	1,21	9,3
3	8,31	5,80	100	100	21,9	74,5	-	36,7	-	10,7	-	-	8,3
4	8,58	8,79	100	100	25,9	52,3	-	39,8	-	12,4	-	2,38	9,3
5	15,5	4,07	100	100	33,9	62,7	2,84	38,1	-	18,4	-	-	8,7

Po 24 hodinách byla fytoextrakce naproxenu průměrně pod 26 % výchozí koncentrace, lze tedy diklofenak považovat za faktor snižující účinnost extrakce naproxenu, ovšem toto snížení není nijak rapidní, jde v průměru o 6 %. Zajímavější je fakt, že extrakce diklofenaku se za přítomnosti naproxenu zvětšila v průměru o 17 % a to v průměru pod 59 % výchozí koncentrace. Experiment byl ukončen po 96 hodinách, kdy ještě dvě kultivace obsahovaly minimální množství diklofenaku, ovšem naproxen byl rostlinami slunečnice vyextrahován pod mez detekce již po 72 hodinách.

Schopnost fytoextrakce sledovaných látek byla studována i u jiného kultivaru slunečnice roční a to kultivaru Belem. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 7a. – 7c..

Tab. 7a. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu rostlinami slunečnice Belem

Slunečnice roční kultivar Belem NAPROXEN							
Exp. číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]					Hmot. rostl. [g]
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	
1	19,34	100	31,9	7,24	3,21	1,24	8,5
2	21,20	100	21,5	2,26	1,13	0,80	9,9
3	23,44	100	49,1	9,30	2,90	0,43	5,3
4	23,68	100	38,6	19,7	6,93	2,49	4,2
5	24,47	100	13,5	0,33	-	-	9,0

Po 24 hodinách experimentu byla hodnota naproxenu v kultivačním médiu průměrně pod 31 % výchozí koncentrace. To je menší fytoextrakční schopnost v prvních 24 hodinách než u kukuřice i slunečnice Orasole, což poukazuje na rozdíly ve fytoextrakčních schopnostech u různých kultivarů jednoho druhu rostliny. Pouze jeden studovaný vzorek (experiment číslo 5) klesl po 96 hodinách v obsahu naproxenu pod mez detekce. Slunečnice Belem se nejeví jako vhodná fytoextrakční species, vzhledem k pomalé fytoextrakci oproti předchozí kukuřici a slunečnici Orasole.

Tab. 7b. – Časový průběh fytoextrakce diklofenaku rostlinami slunečnice Belem

Slunečnice roční kultivar Belem DIKLOFENAK							
Exp. číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]					Hmot. rostl. [g]
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	
1	16,73	100	47,4	45,1	14,6	6,10	8,9
2	16,95	100	62,1	29,7	8,61	1,95	9,7
3	19,91	100	49,2	42,2	15,5	8,14	8,1
4	20,89	100	46,9	32,6	7,71	1,48	12,5
5	22,93	100	34,2	30,3	9,86	3,27	10,3

Za 24 hodin klesla koncentrace diklofenaku průměrně pod 48 % výchozí koncentrace a ani po 96 hodinách se koncentrace nesnížila pod mez detekce, což ukazuje, že kultivar Belem sice není tou nejvhodnější rostlinou pro fytoextrakci naproxenu, zato je vhodnější rostlinou pro samotný diklofenak, jelikož dosáhla daleko lepší fytoextrakční výsledky než slunečnice Orasole. Experiment byl ukončen po 96 hodinách pro neuspokojivé výsledky.

Tab 7c. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu za přítomnosti diklofenaku u rostlin slunečnice Belem

Slunečnice roční kultivar Belem NAPROXEN + DIKLOFENAK													
E x p č .	Výchozí koncentrace [mg/l]		Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]										H. r. [g]
	N	D	0 hod		24 hod		48 hod		72 hod		96 hod		
			N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	
1	16,21	7,65	100	44,5	84,6	7,09	52,4	2,84	33,9	1,05	16,5	9,1	
2	17,31	9,19	100	36,6	59,3	6,30	30,4	4,51	13,7	2,31	9,68	9,5	
3	17,34	9,20	100	39,4	74,9	11,5	43,9	3,81	20,8	1,10	11,1	7,4	
4	17,44	9,27	100	32,5	59,0	9,29	38,7	5,91	17,2	2,92	8,09	9,0	
5	17,51	9,73	100	37,9	59,6	13,8	34,7	4,23	17,6	1,83	10,5	9,2	

Výchozí koncentrace naproxenu klesla po 24 hodinách průměrně pod 39 % . Oproti samotnému naproxenu se schopnost fytoextrakce slunečnice Belem za vlivu diklofenaku snížila v průměru o 8 % . Fytoextrakce diklofenaku byla po 24 hodinách průměrně pod 68 %, což je oproti samotnému diklofenaku zhoršení. Ovšem slunečnice Belem poskytuje zcela opačné výsledky než slunečnice Orasole, která měla ve směsi vyšší fytoextrakci diklofenaku za přítomnosti naproxenu.

Srovnáním výsledků obou kultivarů (Orasole, Belem) slunečnice se dojde k zajímavým závěrům. Pro lepší přehlednost uvedeno v tabulce:

Tab 8.– Srovnání fytoextrakčních schopností jednotlivých kultivarů slunečnice

Kultivar slunečnice	Naproxen	Diklofenak	Směs	
			N	D
Orasole	+	-	+	+
Belem	-	+	-	-

Porovnání pomocí znamének + a -, dle toho jak se jeví jejich fytoextrakční schopnosti oproti druhému kultivaru.

Další pokusnou species se stala řepka olejka nebo-li ozimá kultivaru Cadeli, jejíž schopnost fytoextrakce je vyhodnocena v Ta 9a.-9c.

Tab. 9a. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu rostlinami řepky Cadeli

Řepka ozimá kultivar Cadeli NAPROXEN							
Exp. číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]					Hmotnost rostliny [g]
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	
1	7,43	100	56,9	23,4	12,4	2,02	5,8
2	10,34	100	57,6	16,7	5,90	2,22	4,7
3	11,26	100	30,6	21,6	11,1	4,44	4,9
4	11,35	100	45,5	9,34	3,88	1,85	5,7
5	12,23	100	61,6	13,1	1,64	-	4,9
6	12,36	100	48,6	19,3	4,53	1,21	4,4

Výchozí koncentrace naproxenu klesla po 24 hodinách průměrně na hodnotu okolo 50 %, což je v případě naproxenu nejhorší výsledek studie schopnosti fytoextrakce rostlinami v této práci. Takto pomalá fytoextrakce může být způsobena celkově malým množstvím biomasy oproti ostatním rostlinám a pak samozřejmě menší schopností fytoextrahovat naproxen z živného média. Po 96 hodinách už koncentrace byla poměrně nízká (pod 2,5 % výchozí koncentrace) a jedna kultivace již byla pod mezí detekce. Vliv množství biomasy na pomalejší fytoextrakci v tomto případě by však byl v rozporu s doposud vyhodnocenými experimenty.

Tab. 9b. – Časový průběh fytoextrakce diklofenaku rostlinami řepky Cadeli

Řepka ozimá kultivar Cadeli DIKLOFENAK							
Exp. číslo	Výchozí koncentrace [mg/l]	Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]					Hmotnost rostliny [g]
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	
1	11,22	100	97,6	63,6	35,3	22,6	6,6
2	17,25	100	72,2	57,6	57,2	22,0	5,1
3	19,50	100	50,6	32,7	15,8	7,23	4,9
4	20,20	100	76,7	37,1	18,9	5,94	4,5
5	20,93	100	52,1	23,5	18,4	7,60	5,8
6	21,25	100	52,8	32,3	12,7	5,74	5,7

Průměrná hodnota koncentrace diklofenaku po 24 hodinách byla okolo 67 % výchozí koncentrace. Celkově je fytoextrakce diklofenaku pomalejší u všech studovaných species,

ovšem řepka se vyznačuje pomalou fytoextrakcí i u naproxenu. Zde se opět nabízí úvaha vlivu množství biomasy či fytoextrakční nevhodnosti dané rostliny.

Tab. 9c. – Časový průběh fytoextrakce naproxenu za přítomnosti diklofenaku u rostlin řepky Cadeli

Řepka ozimá kultivar Cadeli NAPROXEN + DIKLOFENAK													
E x p č .	Výchozí koncentrace [mg/l]		Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]										H. r. [g]
	N	D	0 hod		24 hod		48 hod		72 hod		96 hod		
			N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	
1	11,18	12,57	100	65,7	88,3	55,0	44,9	53,1	25,8	43,9	12,3	3,2	
2	11,28	14,08	100	45,0	76,9	35,8	71,7	27,4	50,2	21,4	40,3	5,0	
3	11,31	13,01	100	45,9	57,7	31,5	45,0	25,1	42,7	24,8	20,4	4,0	
4	11,92	14,25	100	47,5	75,5	31,1	65,3	23,7	52,5	9,56	35,5	4,7	
5	12,09	18,25	100	78,4	55,1	64,1	33,5	46,5	26,6	30,5	20,4	4,5	
6	12,30	19,28	100	63,7	57,4	50,1	27,2	39,0	24,4	21,2	21,3	4,6	
7	12,98	20,36	100	55,0	55,8	42,8	32,8	34,1	14,6	12,6	4,32	5,0	

Po 24 hodinách se snížila koncentrace naproxenu průměrně pod 58 % a diklofenaku pod 66 % výchozí koncentrace. U naproxenu lze hovořit o snížení účinnosti fytoextrakce vlivem diklofenaku, ovšem ne nijak rapidní cca 8 %, zato fytoextrakce diklofenaku se opět zvýšila, sice nepatrně cca 1 %. Fytoextrakce v obou případech v tomto experimentu byla pomalá.

Účinnost fytoextrakce ani jedné sledované rostlinné species nekoreluje s množstvím biomasy, ve smyslu přímé závislosti hmotnosti rostliny na účinnosti fytoextrakce, ani s výchozí koncentrací naproxenu, diklofenaku či směsi.

Jen u rostlin řepky, kde byla fytoextrakce výrazně pomalejší se nabízí dva faktory, které rychlost fytoextrakce mohly ovlivnit. A to, že řepka netvoří dostatek biomasy či není rostlinou vhodnou pro fytoextrakci sledovaných látek, jelikož extrakce je výrazně pomalejší než u ostatních sledovaných druhů.

Ačkoli nebylo tématem práce sledování vlivu naproxenu na fytoextrakci diklofenaku, ale zcela opačně, lze vyvozovat, že přítomnost naproxenu v živném médiu zvýšila fytoextrakci diklofenaku za snížení fytoextrakce naproxenu.

Z uvedených výsledků je zřejmá poměrně účinná fytoextrakce naproxenu z vodného media, v porovnání s diklofenakem je vyšší (až na výjimku u kukuřice, kde jedna hodnota

zcela vybočuje, ovšem byla ponechána v souboru dat pro autentičnost) a v přítomnosti diklofenaku se snižuje.

Transport do nadzemních částí rostlin nebyl vyhodnocován, jelikož nebyl přímým cílem této práce.

Na základě uvedených měření se jeví rostliny kukuřice jako nejvýhodnější rostlina pro fytoextrakci obou uvedených látek z vodného média. Po srovnání s výsledky fytoextrakce ibuprofenu a diklofenaku, který patří do stejné farmakoterapeutické skupiny, byla nalezena vyšší účinnost rostlin pro extrakci naproxenu.

6.ZÁVĚR

Ze získaných dat a srovnáním s již dříve získanými daty vyplývá, že naproxen je podstatně lépe extrahován z kapalného média, než další látky ze stejné farmakoterapeutické skupiny jako je ibuprofen či diklofenak. Fytoextrakce naproxenu je přítomností diklofenaku nepříznivě ovlivněna. Výsledky ukazují na poměrně komplikovanou možnost posouzení účinnosti fytoextrakce v podmínkách multikomponentního znečištění a mají spíše teoretický význam ve smyslu poznání dosud málo probádaného mechanismu záchytu xenobiotik kořenovým systémem rostlin.

Použitá literatura:

1. J. Kotyza, P. Soudek, Z. Kafka, T. Vaněk: Léčiva - „nový“ enviromentální polutant, Chem. Listy 103 (2009), 540-547.
2. J. Vymazal: Kořenové čistírny odpadních vod, ENKI o.p.s., Třeboň 2004.
3. Emily Godfrey, William W. Woessner, Mark J. Benotti: Pharmaceuticals in On-Site Sewage Effluent and Ground Water, Western Montana (Article first published online: 12 MAR 2007), 2007 National Ground Water Association, Volume 45, Issue 3, 263–271, May-June 2007 (staženo 21.4.2011).
4. Pitná voda může škodit zdraví (www.idnes.cz, článek z 19.4.2007).
5. Zpráva o kvalitě pitné vody v ČR za rok 2009, soubor: voda_09.pdf. (www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/monitoring-pitne-vody, staženo 21.4.2011)
6. Grantový projekt 'Výskyt a zdravotní rizika humánních léčiv v pitných vodách', soubor: GACR_leciva_zakladni_informace.pdf. (<http://www.szu.cz/search.php?action=results&query=203%2F09%2F1583&x=13&y=8> evidováno pod číslem GAČR203/09/1583, staženo 21.4.2011).
7. M. Stumpf, T.A. Ternes, R.-D. Wilken, S.V. Rodrigues, W. Baumann: polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, Sci. Total Environ. 225 (1999), 135-141.
8. M.J. Benotti, R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.C. Holady, B.D. Stanford, S.A. Snyder: Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water, Environ Sci. Technol. 43 (2009), 597-603.
9. M.D. Hernando, E. Heath, M. Petrovic, D. Barcelo: Trace-level determination of pharmaceuticals residues by LC-MS/MS in natural and treated waters, A pilot-survey study, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006), 985-991.
10. C. Zwiener: Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment, Springer-Verlag (2006 online published), Anal. Bioanal. Chem. (2007) 387, 1159-1162.
11. Anastasia Nikolaou, Sureyya Meric, Despo Fatta: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, Springer-Verlag (online published 2007), Anal bioanal chem (2007) 387, 1225-1234.
12. D. Bendz, N.A. Paxeus, T.R. Ginn, F.J. Loge: Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden, J. Hazard. Mater. 122 (2005) 195-204.
13. K.K. Barnes, D.W. Kolpin, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, M.T. Meyer, L.B. Barber: A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States groundwater, Sci. Total. Environ. 402 (2008) 192-200.
14. S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss: Simultaneous solid-phase extraction of acid, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1023 (2004) 183-195.

15. S. Grujić, T. Vasiljević, M. Lausević: Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4989-5000.
16. M.J. Hilton, K.V. Thomas: determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 129-141.
17. S. Weigel, J. Kuhlmann, H. Hühnerfuss: drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea, *Sci. Total Environ.* 295 (2002) 131-141.
18. D. Calamari, E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli: strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1241-1248.
19. M. Cleuvers: Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid, *Ecotox. Environ. Safe.* 59 (2004) 309-315.
20. K. Kummerer: Pharmaceuticals in the environment – sources, fate, effects and risk, Third edition, kapitola 14, Springer (2008).
21. P. Soudek, Š. Petrová, D. Benešová, J. Kotyza, T. Vaněk: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti, *Chem. Listy* 102 (2008), 346-352.
22. Farmakokinetické a farmakodynamické údaje ze SÚKL ([http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search_for\]=&data\[code\]=&data\[atc_group\]=&data\[material\]=naproxen&data\[path\]=&data\[reg\]=&data\[radio\]=none&data\[rc\]=&data\[with_adv\]=0&search=Vyhledat&data\[listing\]=20](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=&data[code]=&data[atc_group]=&data[material]=naproxen&data[path]=&data[reg]=&data[radio]=none&data[rc]=&data[with_adv]=0&search=Vyhledat&data[listing]=20), staženo 24.3.2011).
23. Farmakokinetické a farmakodynamické údaje ze SÚKL ([http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search_for\]=&data\[code\]=&data\[atc_group\]=&data\[material\]=DIKLOFENAK&data\[path\]=&data\[reg\]=&data\[radio\]=none&data\[rc\]=&data\[with_adv\]=0&search=Vyhledat&data\[listing\]=20](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=&data[code]=&data[atc_group]=&data[material]=DIKLOFENAK&data[path]=&data[reg]=&data[radio]=none&data[rc]=&data[with_adv]=0&search=Vyhledat&data[listing]=20), staženo 24.3.2011).
24. T. Murashige,; F. Skoog.: *Physiol. Plant.* (1962), 15, 473-497.
25. M. Šlechtová: Využití rostlinných biotechnologií k odstraňování farmak ze životního prostředí, Diplomová práce, UK v Praze 2010
26. Data získána ve spolupráci s Marií Vacíkovou: Fytoextrakce/fytotransformace naproxenu, Bakalářská práce, UK v Praze 2009

Použité zkratky:

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HPLC/UV - High Performance Liquid Chromatography s UV detekcí

MS – Mass Spectrometry

GC – Gas Chromatography

SPE – Solid Phase Extraction

